

2/9/1

DIALOG(R) File 351:Derwent WPI
(c) 2001 Derwent Info Ltd. All rts. reserv.

010725941 **Image available**
WPI Acc No: 1996-222896/199623
XRAM Acc No: C96-070755

Amplification of non-characterised DNA fragments - using only a single primer, with formation of hairpin loops during second strand synthesis

Patent Assignee: GOEHLY U (GOEH-I); PACHMANN K (PACH-I)

Inventor: GOEHLY U; PACHMANN K

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 4438630	A1	19960502	DE 4438630	A	19941028	199623 B

Priority Applications (No Type Date): DE 4438630 A 19941028

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 4438630	A1		4	C12P-019/34	

Abstract (Basic): DE 4438630 A

Self-priming, a simple and rapid method for amplification of non-characterised DNA, comprises: (a) carrying out second-strand synthesis at about 20-37 deg.C to favour formation of hairpin structures (4) in the newly formed strand, (b) continuing synthesis of the second strand up to the initial sequence, corresponding to the primer region (5) and (c) amplifying the target sequence with only one adjacent, specific primer.

ADVANTAGE - The method requires only one specific primer (i.e. only one flanking sequence has to be known), is simple, rapid, inexpensive (in materials and labour) and does not require cloning. It produces sufficient DNA for sequencing (using the same primer).

Dwg.1a/1

Title Terms: AMPLIFY; NON; CHARACTERISTIC; DNA; FRAGMENT; SINGLE; PRIME; FORMATION; HAIRPIN; LOOP; SECOND; STRAND; SYNTHESIS

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): C12P-019/34

International Patent Class (Additional): C07H-021/04

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-E01; D05-H12D1; D05-H18

Chemical Fragment Codes (M1):

01 M423 M750 M781 M903 N102 N425 N512 N513 P831 Q233 V753

Chemical Fragment Codes (M6):

02 M903 P831 Q233 R515 R521 R535 R537 R614 R627 R639

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 Offenlegungsschrift
10 DE 44 38 630 A 1

21 Aktenzeichen: P 44 38 630.3
22 Anmeldetag: 28. 10. 94
43 Offenlegungstag: 2. 5. 96

51 Int. Cl.⁸:
C 12 P 19/34
C 07 H 21/04
// G 01 N 33/50, C 12 Q
1/68

DE 44 38 630 A 1

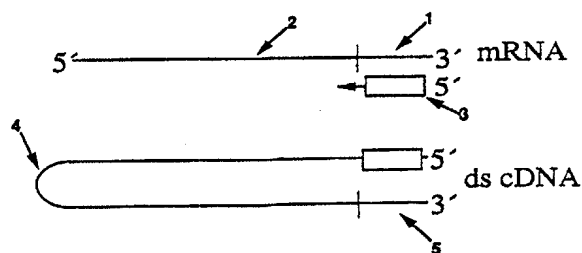
71 Anmelder:
Pachmann, Katharina, Dr., 95448 Bayreuth, DE;
Göhly, Ursula, 83700 Rottach-Egern, DE

72 Erfinder:
gleich Anmelder

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

54 Seifpriming - ein einfaches und schnelles Verfahren zur Amplifikation von nicht charakterisierten DNA-Abschnitten

57 Die Amplifikation von Sequenzen, für die nur eine flankierende Seite bekannt ist, ist mit Hilfe der PCR bisher mit großen Problemen belastet. Das neue Verfahren soll eine ausreichende, rasche, einfache und kostensparende Vervielfältigung solcher Gensequenzen erlauben. Dies wird möglich unter Verwendung eines spezifischen Primers (3) und der Ausnützung der temperaturabhängigen Bildung von Haarnadelstrukturen (4) bei der Zweitstrangsynthese. Ausgehend von einem Primer (3) für die bekannte Sequenz (1) wird in die unbekannte Sequenz (2) synthetisiert, und durch die entsprechende Temperatur der Umschlag und die Rücksynthese bis in die Primerregion (5) gefördert. Anschließend kann eine konventionelle Amplifikation mit dem einen Primer durchgeführt werden. Die Amplifikate können mit Hilfe des zyklischen Sequenzierungsverfahrens analysiert werden.



DE 44 38 630 A 1

Beschreibung

Die Polymerase Ketten Reaktion (PCR) ist innerhalb der letzten Jahre zu einem der am häufigsten angewendeten Verfahren in der Molekulargenetik geworden, um definierte Genabschnitte soweit zu amplifizieren, daß an ihnen weitere Analysen z. B. Sequenzanalysen durchgeführt werden können. Dieses Verfahren benötigt zur Durchführung die Kenntnis zweier kurzer Genabschnitte am Anfang und am Ende der Zielsequenz. Häufig ist jedoch nur eine benachbarte Gensequenz bekannt, wie etwa bei der Analyse umgelagerter Genabschnitte z. B. bei den variablen Sequenzen der Antigenrezeptorgene. Es wurde versucht, solche Sequenzen mit Hilfe von familienspezifischen Primern oder degenerierten Primern (Zeitschrift "American Journal of Pathology" 1993, Vol. 143, No. 1, Seite 230—239) zu amplifizieren oder durch Anheften synthetischer Sequenzen in der Anchored-PCR (Zeitschrift "Science" 1989, Vol. 243, Seite 217—220) oder bei der Panhandle genannten Methode (Zeitschrift "Nucleic Acids Research" 1992, Vol. 20, No. 3, Seite 595—600), bei der es zur Bildung einer Schleife kommt.

Mit allen diesen Methoden wird versucht das Problem zu lösen, daß sich solche Genabschnitte der gängigen Vermehrung durch die PCR entziehen, weil nur eine flankierende Seite und nicht die Anfangs- und Endsequenz bekannt sind.

Dieses Problem wird durch die im Patentanspruch aufgeführten Merkmale besonders schnell und einfach gelöst.

Die mit der Erfindung erzielten Vorteile bestehen insbesondere darin, daß die Amplifikation, für die von der DNA oder der mRNA ausgegangen werden kann, spezifisch mittels nur eines spezifischen Primers, einfach, schnell, kostengünstig (Personal- und Materialkosten) und ohne Klonierung (Voraussetzung S1 Sicherheitsbereich) möglich ist.

Ein Ausführungsbeispiel der Erfindung ist in der Zeichnung dargestellt und wird im folgenden näher beschrieben.

Beispiel

Vorschrift für die mRNA (Fig. 1a Flußdiagramm)

1. Erststrangsynthese

Die Synthese einer cDNA durch die reverse Transkription einer mRNA wird nach Standardvorschrift durchgeführt, wobei ein spezifischer, zur amplifizierenden Sequenz benachbarter Primer (3) verwendet wird.

2. Zweitstrangsynthese (Haarnadelstruktur)

Der Zweitstrang wird üblicherweise bei maximal 15°C synthetisiert, um sogenannte "Haarnadelstrukturen" (4) zu vermeiden. Im Gegensatz dazu, machen wir uns dieses Verhalten zunutze und lassen diese Reaktion bei ca. 20°C—37°C ablaufen.

Erststrang cDNA	40 µl
10 x Puffer	32 µl
(188 mM Tris-HCl pH 8,3; 900 mM KCl; 46 mM MgCl ₂ ; 37,5 mM Dithiothreitol)	
10 mM dNTP Mix	6 µl
steriles DEPC-Aqua dest	232 µl
E. coli DNA Polymerase I (15 U/ml)	8 µl
Inkubation 2 h bei ca. 20°C—37°C	
5 Min. 90°C, 4°C.	

3. Anschluß Amplifikation (PCR)

Weiterführend ist eine Amplifikation mit diesem einen Primer allein möglich.

Aqua dest	
10 x Puffer	10 µl
(100 mM Tris-HCl pH 8,3; 500 mM KCl)	
1,5 mM MgCl ₂	
1,25 mM dNTP Mix	16 µl
1 spez. anliegender Primer (0,1 µM)	
Doppelstrang cDNA	1 µl
Taq Polymerase (5 U/ml)	0,5 µl
	ad 100 µl
30 Zyklen: 95°C 1 Min; 65°C 1 Min; 72°C	
2 Min.	

Für jede Zielsequenz/Primer Konstellation ist eine Optimierung der Amplifikationsbedingungen unerlässlich.

Das entstehende spezifische Produkt kann anschließend mit dem gleichen spezifisch anliegenden Primer sequenziert werden, am besten mit einer Cycle Sequencing Reaktion.

Patentanspruch

Selfpriming — Ein einfaches und schnelles Verfahren zur Amplifikation von nicht charakterisierten DNA Abschnitten, dadurch gekennzeichnet,

- daß bei der Zweitstrangsynthese durch Bevorzugung der Haarnadelstruktur (4) des neu gebildeten DNA Stranges in einem bestimmten Temperaturbereich (ca. 20°C—37°C),
- dieser bis zur Anfangssequenz, entspricht der Primerregion (5), zurücksynthetisiert wird und dadurch
- eine Amplifizierung der Zielsequenz mit nur einem benachbarten spezifischen Primer erreicht wird.

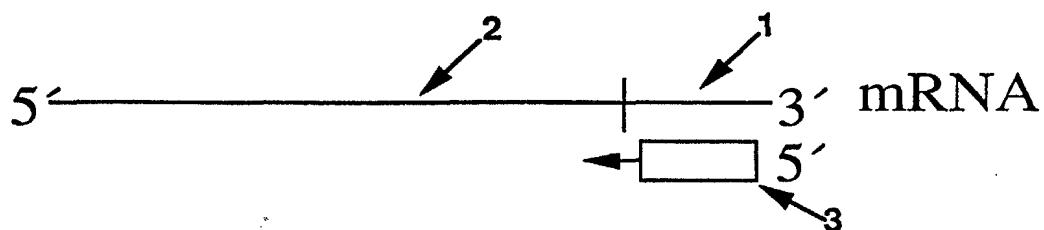
Dieses ermöglicht es in einem zeit- und kostensparenden Verfahren ohne vorausgehendes Klonieren, eine ausreichende Menge eines spezifischen DNA Abschnittes für die Sequenzanalyse herzustellen.

Hierzu 2 Seite(n) Zeichnungen

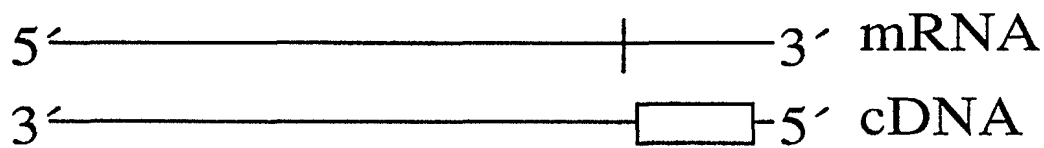
5

Fig. 1a

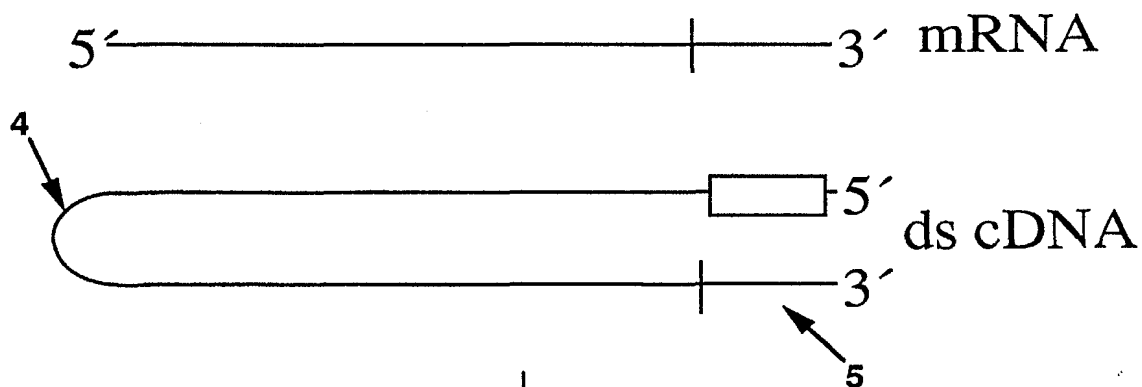
Selfpriming



1. Erststrangsynthese (Reverse Transkription)



2. Zweitstrangsynthese (Haarnadelstruktur)



Amplifikation und Sequenzanalyse

Fig. 1b

